NovaTec Immundiagnostica GmbH

Free Testosterone CE

Enzyme immunoassay for the quantitative determination of Testosterone in human serum or plasma

Dosage immunoenzymatique pour la détermination quantitative de la testostérone libre dans le sérum ou le plasma humain

Only for in-vitro diagnostic use

English:	Page	2 to 7
Français:	Page	8 à 13
Bibliography / Bibliographie	Page	14
Symbols Key / Explication des symboles	Page	15
Summary of Test Procedure/ Résumé de la procédure de test	Page	16

Product Number: DNOV009 (96 Determinations)

ENGLISH

CE

1. INTRODUCTION

Testosterone is a steroid hormone from the androgen group. Testosterone is primarily secreted in the testes of males and the ovaries of females although small amounts are secreted by the adrenal glands. It is the principal male sex hormone and an anabolic steroid. In both males and females, it plays key roles in health and well-being.
Due to its insolubility in aqueous solutions, for the most part Testosterone circulates in the blood bound to transport proteins. Only a small percentage (< 1%) of circulating testosterone exists as unbound or free testosterone. The majority, approximately 60%, is bound to SHBG with high affinity, while the remainder is loosely bound to albumin. Both the albumin-bound and free fractions may be biologically active, while SHBG effectively inhibits testosterone action.
Testosterone effects can be classified as virilising and anabolic effects. Anabolic effects include growth of muscle mass and strength, increased bone density and strength, and stimulation of linear growth and bone maturation. Virilising effects include maturation of the sex organs.
Testosterone levels decline gradually with age in men.
Measurement of the free or unbound fraction of serum testosterone has been proposed as a means of estimating the physiologically bioactive hormone. Free testosterone levels are elevated in women with hyperandrogenism associated with hirsutism in the presence or absence of polycystic ovarian disease. In addition, free testosterone measurements may be more useful than total testosterone in situations where SHBG is increased or decreased (e.g. hypothyroidism and obesity).

2. INTENDED USE

Competitive immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of free Testosterone in human serum or plasma.

3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

In blood Testosterone is bound to SHBG (60%) and in lower quantity to other proteins (for example albumin). Only the measurement of Free Testosterone (< 1% of Total Testosterone) permits the estimating of the biologically active hormone.
Microtiter strip wells are precoated with anti-Testosterone antibodies (solid-phase). Free Testosterone in the sample competes with added horseradish peroxidase labelled Testosterone (enzyme-labelled antigen) for antibody binding. The Testosterone bound to proteins does not take part to this reaction, so it is washed away during the washing step (for total Testosterone measurement the ELISA NovaTec “Testosterone” kit is available). After incubation a bound/free separation is performed by solid-phase washing. The immune complex formed by enzyme-labelled antigen is visualized by adding Tetramethylbenzidine (TMB) substrate which gives a blue reaction product. The intensity of this product is **inversely** proportional to the amount of Testosterone in the sample. Sulphuric acid is added to stop the reaction. This produces a yellow endpoint colour. Absorption at 450 nm is read using an ELISA microwell plate reader.
Testosterone in the blood is bound to SHBG (60 %) and in lower quantity to other protein. Only the measurement of Free Testosterone (< 1% of Total Testosterone) permits the estimating of the hormone biologically active.

4. MATERIALS

4.1. Reagents supplied

- **Anti-Testosterone IgG Coated Wells:** 12 breakapart 8-well snap-off strips coated with anti-Testosterone IgG, in resealable aluminium foil.
- **Stop Solution**: 1 bottle containing 15 ml sulphuric acid, 0.15 mol/l (avoid any skin contact).
- **Testosterone-HRP conjugate:** 1 bottle containing 15 ml of horseradish peroxidase labelled Testosterone.
- **TMB Substrate Solution**: 1 bottle containing 15 ml 3, 3´, 5, 5´-tetramethylbenzidine (H_2O_2-TMB 0.26g/l) (avoid any skin contact).
- **Wash solution 10x conc**.: 1 bottle containing 50 ml of a 10x concentrated solution of phosphate buffer 20 mM, NaCl 160 g/l, Tween-20 10 g/l, pH 7.4
- **Free Testosterone control**: 1 bottle containing 1 ml of a lot-specific, ready to use control solution. The concentration is stated on the label.
- **Testosterone Standards:** 6 bottles, 1 ml each
- Standard 0: 0.0 pg/ml
- Standard 1: 0.2 pg/ml
- Standard 2: 1.0 pg/ml
- Standard 3: 4.0 pg/ml
- Standard 4: 20.0 pg/ml
- Standard 5: 100.0 pg/ml

4.2. Materials supplied

- 1 Strip holder
- 1 Cover foil
- 1 Test protocol
- 1 Distribution and identification plan

4.3. Materials and Equipment needed

- ELISA microwell plate reader, equipped for the measurement of absorbance at 450 nm, 620-630 nm
- Incubator 37°C
- Manual or automatic equipment for rinsing wells
- Pipettes
- Vortex tube mixer
- Distilled water
- Disposable tubes
- Timer

5. STABILITY AND STORAGE

The reagents are stable up to the expiry date stated on the label when stored at 2...8 °C in the dark.

6. REAGENT PREPARATION

It is very important to bring all reagents, samples and standards to room temperature (22…28°C) for at least 30 minutes before starting the test run! At the end of the assay store the reagents immediately at 2-8° C; avoid long exposure to room temperature.

6.1. Coated snap-off Strips

The ready to use break apart snap-off strips are coated with anti-Testosterone IgG antibodies. Store at 2…8 °C. Open the bag only when it is at room temperature. *Immediately after removal of strips, the remaining strips should be resealed in the aluminium foil along with the desiccant supplied and stored at 2…8 °C; stability until expiry date*

6.2. Testosterone-HRP Conjugate

Testosterone-HRP Conjugate is a ready to use solution.

6.3. Testosterone Standards

Before use mix 5 min. with a rotating mixer. The standards are ready to use and have the following concentration of free Testosterone:

Standard 0:	0.0 pg/ml
Standard 1:	0.2 pg/ml
Standard 2:	1.0 pg/ml
Standard 3:	4.0 pg/ml
Standard 4:	20.0 pg/ml
Standard 5:	100.0 pg/ml

The solutions have to be stored at 2…8 °C.
After first use the standards are still stabile for another 6 months if stored at 2-8°C.

6.4. TMB Substrate Solution

The bottle contains 15 ml of a tetramethylbenzidine/hydrogen peroxide system. The reagent is ready to use and has to be stored at 2...8°C in the dark. *The solution should be colourless or could have a slight blue tinge. If the substrate turns into blue, it may have become contaminated and should be thrown away*.

6.5. Stop Solution

The bottle contains 15 ml 0.15 M sulphuric acid solution (R 36/38, S 26). This ready to use solution has to be stored at 2...8°C.

6.6. Wash Solution

Dilute the content of the concentrated Wash Solution with distilled water to a final volume of 500 ml prior to use. For smaller volumes respect the 1:10 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2…8°C. In concentrated wash solution it is possible to observe the presence of crystals, in this case mix at room temperature until complete dissolution of crystals, for greater accuracy dilute the whole bottle of concentrated wash solution to 500ml on taking care also to transfer crystals with washing of the bottle, then mix until crystals are completely dissolved.

6.7. Control

The bottle contains 1ml of a lot-specific, ready to use control solution.

7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

The determination of Free Testosterone can be performed in human serum or plasma. Store specimen at -20°C if the determination is not performed on the day of the sample collection. If samples are stored frozen, mix thawed samples well before testing. *Avoid repeated freezing and thawing.*

8. ASSAY PROCEDURE

8.1. Test Preparation

Please read the test protocol carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the test protocol as described. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all specimens and standards should be carefully established on the result sheet supplied in the kit. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If it lasts more than ten minutes, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve. Please allocate at least:

1 well	(e.g. A1)	for the substrate blank
2 wells	(e.g. B1+C1)	for standard 0
2 wells	(e.g. D1+E1)	for standard 1
2 wells	(e.g. F1+G1)	for standard 2
2 wells	(e.g. H1+A2)	for standard 3
2 wells	(e.g. B2+C2)	for standard 4
2 wells	(e.g. D2+E2)	for standard 5
2 wells	(e.g. F2+G2)	for control

It is recommended to determine standards and patient samples in duplicate.
Perform all assay steps in the order given and without any appreciable delays between the steps.

A clean, disposable tip should be used for dispensing each standard and each patient sample.

Adjust the incubator to 37 °C.

1. Dispense 20 µl standards, control and samples into their respective wells. Add 100 µl conjugate to each well. Leave well A1 for substrate blank.
2. Cover wells with the foil supplied in the kit.
3. **Incubate for 1 hour at 37°C.**
4. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content of the wells and wash each well three times with 300 µl diluted wash solution. Avoid overflows from the reaction wells. During each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel. (If you use automated equipment, wash the wells at least 5 times.

   Note: Washing is critical! Insufficient washing results in poor precision and falsely elevated absorbance values.
5. Dispense 100 µl TMB Substrate Solution into all wells.
6. **Incubate for exactly 15 min at room temperature (22 – 28°C) in the dark.**
7. Dispense 100 µl Stop Solution into all wells in the same order and at the same rate as for the TMB Substrate Solution. Shake the microplate gently.
   Any blue colour developed during the incubation turns into yellow.
8. Measure the absorbance (E) of the specimen at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against blank within 5 min after addition of the Stop Solution.

8.2. Measurement

Adjust the ELISA Microwell Plate Reader **to zero** using the **substrate blank in well A1**.

If - due to technical reasons - the ELISA reader cannot be adjusted to zero using the substrate blank in well A1, subtract the absorbance value of well A1 from all other absorbance values measured in order to obtain reliable results!

Measure the absorbance of all wells at **450 nm** and record the absorbance values for each standard and patient sample in the distribution and identification plan.

Where applicable calculate the **mean absorbance values** of all duplicates.

9. RESULTS

9.1. Calculation of results

Calculate the mean absorbance for each point of the standard curve and each sample. Plot the mean value of absorbance of the standards against concentration. Draw the best-fit curve through the plotted points. (Four Parameter Logistic).
Interpolate the values of the samples on the standard curve to obtain the corresponding values of the concentrations expressed in pg/ml.

9.2. Reference values

Serum concentrations of free testosterone are within the following ranges:

	Median	Mean ± 1SD pg/ml	Range pg/ml
Normal Male	14	13 ± 7	4.5 - 42
Female:			
Ovulating	1.3	1.4±0.9	ND - 4.1
Oral contraceptives	0.9	1.1± 0.6	0.3 - 2.0
Postmenopausal	0.8	0.9±0.5	0.1 – 1.7

Please pay attention to the fact that the determination of a range of expected values for a “normal” population in a given method is dependent on many factors, such as specificity and sensitivity of the method used and type of population under investigation. Therefore each laboratory should consider the range given by the manufacturer as a general indication and produce their own range of expected values based on the indigenous population where the laboratory works.

10. QUALITY CONTROL

Each laboratory should assay controls at normal, high and low levels range of free testosterone for monitoring assay performance. These controls should be treated as unknowns and values determined in every test procedure performed. Quality control charts should be maintained to follow the performance of the supplied reagents. Pertinent statistical methods should be employed to ascertain trends. The individual laboratory should set acceptable assay performance limits. Other parameters that should be monitored include the 80, 50 and 20% intercepts of the standard curve for run-to-run reproducibility. In addition, maximum absorbance should be consistent with past experience. Significant deviation from established performance can indicate unnoticed change in experimental conditions or degradation of kit reagents. Fresh reagents should be used to determine the reason for the variations.
If computer controlled data reduction is used to calculate the results of the test, it is imperative that the predicted values for the calibrators fall within 10% of the assigned concentrations.

11. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1. Precision

Intra Assay Variation
Within run variation was determined by replicate determination (15x) of three different sera in one assay. The within assay variability is < 10 %.

Inter Assay Variation
Between run variation was determined by replicate measurements of five different control sera and two different sera in 10 different assays. The between assay variability is < 10 %.

11.2. Specificity

The specificity was assessed by measuring the apparent response of the assay to the following potentially cross-reactive analytes and interfering substances (Anticoagulants). The cross reaction of the antibody calculated at 50% according to Abraham:

Testosterone	100.0 %
DHT	0.00008 %
Androstenedione	0.0043 %
Androsterone	0.00029 %
DHEA-S	0.00007 %
Cortisol	< 0.00001 %
Cortisone	< 0.00001 %
17 β Estradiol	0.00005 %
Estrone	< 0.00001 %
Prednisone	< 0.00001 %
17 α Ethynilestradiol	< 0.00001 %
Norgestrel	0.00001 %
Danazol	< 0.00001 %
Aldosterone	< 0.00001 %
Sodium citrate	< 0.00001 %
EDTA	< 0.00001 %
Heparin	< 0.00001 %

11.3. Analytic Sensitivity

Sensitivity was assessed by using 20 replicates of standard 0 and minimum 2 of standard 1. The lowest detectable concentration of Free Testosterone is 0.06 pg/ml.

11.4. Method comparison

The free testosterone ELISA was compared to another commercially available free testosterone assay (RIA). 41 serum samples were analysed according in both test systems.
The linear regression curve was calculated

(Free Testosterone NovaTec) = 0.957*(Free Testosterone RIA) + 0.953

$r^2 = 0.937$

12. PRECAUTIONS AND WARNINGS

- In compliance with article 1 paragraph 2b European directive 98/79/EC the use of the in vitro diagnostic medical devices is intended by the manufacturer to secure suitability, performances and safety of the product. Therefore the test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The use of the testkits with analyzers and similar equipment has to be validated. Any change in design, composition and test procedure as well as for any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes. The manufacturer is not liable for false results and incidents for these reasons. The manufacturer is not liable for any results by visual analysis of the patient samples.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested. To improve the performance of the kit on ELISA automatic systems, it is recommended to increase the number of washes.
- Only for in-vitro diagnostic use. Not for internal or external use in humans or animals.
- All components of human origin used for the production of these reagents have been tested for anti-HIV antibodies, anti-HCV antibodies and HBsAg and have been found to be non-reactive. Nevertheless, all materials should still be regarded and handled as potentially infectious.
- Do not interchange reagents or strips of different production lots.
- No reagents of other manufacturers should be used along with reagents of this test kit.
- Do not use reagents after expiry date stated on the label.
- Use only clean pipette tips, dispensers, and lab ware.
- Do not interchange screw caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- After first opening and subsequent storage check conjugate and control vials for microbial contamination prior to further use.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense conjugate without splashing accurately to the bottom of wells.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- Some reagents contain small amounts of Proclin 300® as preservative. Avoid the contact with skin or mucosa.
- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H2O2 to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.
- This method allows the determination of Free Testosterone from 0.06 pg/mL to 100.0 pg/mL.
- The clinical significance of Free Testosterone determination can be invalidated if the patient was treated with cortisone or natural or synthetic steroids.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.
- The NovaTec ELISA is only designed for qualified personnel who are familiar with good laboratory practice.

12.1. Disposal Considerations

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose hazardous waste.

13. ORDERING INFORMATION

Prod. No.:	DNOV009	Free Testosterone (96 Determinations)

FRANÇAIS

CE

1. INTRODUCTION

La testostérone est une hormone stéroïdienne du groupe androgène. La testostérone est secrétée dans les testicules et les ovaires bien que de petites quantités soient secrétées dans les glandes adrénales. C'est l'hormone sexuelle masculine principale et un stéroïde anabolisant. Elle joue un rôle essentiel dans le bien-être et la santé chez l'homme et la femme.
En raison de son insolubilité dans les solutions aqueuses, pour la plupart la Testostérone ciruclates dans le sang s'est liée pour transporter des protéines. Seul 1-2% des testostérones circulantes existent sous une forme non liée ou libre. La majorité, environ 60%, a une forte affinité avec le SHBG, alors que le reste est faiblement lié à l'albumine. L'albumine liée et les fractions libres peuvent être biologiquement actives, alors que le SHBG inhibe efficacement l'action de la testostérone.
Les effets de la testostérone peuvent être classés en tant qu'effets virilisants et anabolisants. Les effets anabolisants conduisent à l'augmentation de la masse musculaire et de la force, l'augmentation de la densité osseuse et de la résistance osseuse, l'augmentation linéaire de la stimulation et de la maturation des os. Les effets virilisants conduisent à la maturation des organes sexuels.
Chez les hommes, les niveaux de la testostérone diminuent graduellement avec l'âge.
La mesure de la fraction libre ou liée du sérum de la testostérone a été proposée comme un moyen d'estimation de l'hormone physiologique bioactive. Les niveaux de la testostérone libre sont élevés chez les femmes ayant un hyperandrogénisme associé à un hirsutisme en présence ou non de maladie des ovaires polykystiques. De plus, les mesures de la testostérone libre peuvent être plus utiles que la testostérone totale dans le cas où le SHBG est augmenté ou diminué (ex. Hypothyroïdisme et obésité).

2. INDICATION D'UTILISATION

La méthode colorimétrique immunoenzymatique compétitive est utilisée pour la détermination quantitative de la testostérone libre dans le sérum ou le plasma humain.

3. PRINCIPE DU DOSAGE

La testostérone présente dans le sang est liée à la SHBG (60%) et dans des quantités inférieures aux autres protéines (par exemple l'albumine). Seule la mesure de testostérone libre (< 1 % de testostérone totale) permet l'estimation de l'hormone biologiquement active.
Les puits de bandes de microdosage sont enduits d'anticorps anti-testostérone (phase solide). La testostérone dans l'échantillon rivalise avec la testostérone marquée à la peroxydase de raifort ajoutée (antigène marqué à l'enzyme) pour la liaison des anticorps. Après incubation, une séparation entre les produits liés et les anticorps libérés est effectuée par le rinçage de la phase solide. Le complexe immun formé par un antigène marqué à l'enzyme est observé par un ajout de substrat Tétraméthylbenzidine (TMB) qui conduit à un bleuissement du produit. L'intensité de ce produit est **inversement** proportionnelle à la quantité de testostérone dans l'échantillon. L'acide sulfurique est ajouté pour arrêter la réaction. Ceci produit une couleur jaune. Un lecteur de microplaques ELISA permet la lecture de l'absorption à 450 nm.

4. MATERIELS

4.1. Réactifs fournis

- **Puits recouverts d'IgG Anti-Testostérone :** 12 bandes détachables enduites d'IgG anti-testostérone de 8 puits, en sachet d'aluminium refermable.
- **Solution stop :** 1 flacon contenant 15 ml d'acide sulfurique, 0.15 mol/l (éviter tout contact avec la peau).
- **Conjugué à la Testostérone-HRP :** 1 flacon contenant 15 ml de Testostérone marqué à la peroxydase de raifort.
- **Solution de TMB :** 1 flacon contenant 15 ml de 3, 3´, 5, 5´-Tétraméthylbenzidine (H_2O_2-TMB 0.26g/l) (éviter tout contact avec la peau).
- **Solution de lavage (concentrée x 10) :** 1 flacon contenant 50 ml d'une solution de tampon phosphate concentrée 10 fois à 20 mM, NaCl 160 g/l, Tween-20 10 g/l, pH 7.4
- **Contrôle de testostérone libre :** 1 flacon contenant 1 ml d'un lot spécifique d'une solution de contrôle prête à l'emploi. La concentration est indiquée sur l'étiquette.
- **Etalons Testostérone :** 6 flacons, 1 ml chacun

Etalon 0:	0.0 pg/ml
Etalon 1:	0.2 pg/ml
Etalon 2:	1.0 pg/ml
Etalon 3:	4.0 pg/ml
Etalon 4:	20.0 pg/ml
Etalon 5:	100.0 pg/ml

4.2. Matériels fournis

- 1 support de plaque
- 1 jeu de feuilles de recouvrement

- 1 mode d'emploi
- 1 schéma de distribution et d'identification

4.3. Matériels et équipements requis

- Lecteur de microplaques ELISA, pour mesure l'absorbance à 450 nm, 620-630 nm
- Incubateur 37℃
- Equipement manuel ou automatique pour le rinçage des puits
- Pipettes
- Vortex
- Eau distillée
- Tubes jetables
- Chronomètre

5. STABILITE ET CONSERVATION

Les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette s'ils sont conservés entre 2°C et 8 °C à l'obscurité.

6. PREPARATION DES REACTIFS

Il est très important que tous les réactifs, échantillons et contrôles soient portés à température ambiante (22°C – 28 °C) pour au moins 30 minutes avant de commencer le dosage ! À la fin de l'essai conservent les réactifs immédiatement à 2-8 ° C ; évitez la longue exposition à température ambiante.

6.1. Bandes détachables enduites

Les bandes détachables sont enduites d'anticorps d'IgG anti-testostérone et sont prêtes à l'emploi. Conserver entre 2°C et 8℃. N'ouvrir l'emballage que si la pièce est à température ambiante. *Après avoir prélevé les bandes nécessaires, refermer immédiatement les autres dans le sachet d'aluminium avec le déshydratant fourni et les conserver entre 2°C et 8°C ; elles sont stables jusqu'à la date de péremption*

6.2. Conjugué à la Testostérone-HRP

Solution de conjugué à la Testostérone-HRP prête à l'emploi.

6.3. Etalons de Testostérone

Mélanger 5 minutes avant utilisation avec un vortex. Les étalons sont prêts à l'emploi et ont les concentrations de testostérone libre suivantes :

Etalon 0:	0.0 pg/ml
Etalon 1:	0.2 pg/ml
Etalon 2:	1.0 pg/ml
Etalon 3:	4.0 pg/ml
Etalon 4:	20.0 pg/ml
Etalon 5:	100.0 pg/ml

Les solutions doivent être conservées entre 2°C et 8 °C.
Après la première utilisation les contrôles restent stables pendant encore 6 mois s'ils sont conservés à 2 – 8° C.

6.4. Solution TMB

Le flacon contient 15 ml d'un mélange de peroxyde d'hydrogène et de tétraméthylbenzidine. Le réactif est prêt à l'emploi et doit être conservé 2°C et 8℃ à l'obscurité. *La solution doit être incolore ou avoir une légère teinte bleue. Si le substrat devient bleu, il a pu être contaminé et doit être remplacé*.

6.5. Solution stop

Le flacon contient 15 ml d'une solution d'acide sulfurique 0.15 M (R 36/38, S 26). Cette solution est prête à l'emploi et doit être conservée entre 2°C et 8 °C.

6.6. Solution de lavage

Diluer le contenu de la solution de lavage concentrée avec de l'eau distillée jusqu'à un volume final de 500 ml avant utilisation. Pour les petits volumes respecter la dilution au $10^{ème}$. La solution de lavage diluée est stable pendant 30 jours entre 2°C et 8 °C. Il est possible d'observer la présence de cristaux dans la solution de lavage concentrée, dans ce cas, mélanger à température ambiante jusqu'à la dissolution complète des cristaux, pour une meilleure efficacité diluer tout le flacon de solution de lavage jusqu'à 500ml en surveillant le transfert de cristaux avec le lavage de la bouteille, puis mélanger jusqu'à la dissolution complète des cristaux.

6.7. Contrôle

Le flacon contient 1ml d'une solution de contrôle prête à l'emploi.

7. PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Les échantillons de plasma ou de sérum humain pour ces dosages doivent être prélevés sur des patients à jeun. Conserver les échantillons à -20°C si la détermination n'est pas effectuée le jour du prélèvement. Si les échantillons sont conservés congelés, bien mélanger les échantillons décongelés avant le dosage. *Eviter les cycles répétés de congélation et de décongélation.*

8. PROCEDE DU DOSAGE

8.1. Préparation du dosage

Lire attentivement la notice d'emploi **avant de** réaliser le dosage. La fiabilité des résultats dépend du suivi strict du protocole. Avant de commencer le dosage, déterminer, sur le formulaire fourni dans le kit, le plan de distribution et d'identification des échantillons et des contrôles. Sélectionner le nombre de bandes ou de puits nécessaires et les placer sur le support. Le pipetage des échantillons ne doit pas prendre plus de 10 minutes afin d'éviter toutes dérives du dosage. Si cela dure plus de 10 minutes, suivre le même ordre d'utilisation. Si plusieurs plaques sont utilisées, il est recommandé de répéter la courbe dose/réponse. Réserver au moins :

1 puits	(ex. A1)	Pour le blanc
2 puits	(ex. B1+C1)	Pour l'étalon 0
2 puits	(ex. D1+E1)	Pour l'étalon 1
2 puits	(ex. F1+G1)	Pour l'étalon 2
2 puits	(ex. H1+A2)	Pour l'étalon 3
2 puits	(ex. B2+C2)	Pour l'étalon 4
2 puits	(ex. D2+E2)	Pour l'étalon 5
2 puits	(ex. F2+G2)	Pour le contrôle

Il est recommandé de déterminer les contrôles et les échantillons du patient en doublets.
Réaliser toutes les étapes du dosage dans l'ordre donné et sans interruption entre les étapes.
Un cône de pipette propre et jetable doit être utilisé pour distribuer chaque contrôle et échantillon.
Régler l'incubateur à 37°C.

1. Pipeter 20 µl d'étalons, de contrôles et d'échantillons dans leurs puits respectifs. Ajouter 100µl de conjugué dans chaque puits. Garder le puits A1 pour le blanc.
2. Couvrir les puits avec le couvercle fourni dans le kit.
3. **Incuber pendant 1 heure à 37 °C.**
4. À la fin de l'incubation, enlever le couvercle, aspirer le contenu des puits et laver chaque puits trois fois avec 300 µl de solution de lavage diluée. Eviter les débordements de puits de réaction. Pendant chaque pas de lessive, secouez doucement la plaque depuis 5 secondes et enlevez la solution d'excès en tapant la plaque inversée sur un essuie-mains en papier absorbant. (Si vous utilisez l'équipement automatisé, lavez les puits au moins 5 fois.

   Note : L'étape de lavage est très importante ! Un lavage insuffisant peut conduire à une précision faible et des valeurs d'absorbance faussement élevées.
5. Pipeter 100 µl de solution de TMB dans tous les puits.
6. **Incuber pendant exactement 15 min à température ambiante (22 – 28℃) à l'obscurité.**
7. Pipeter 100 µl de solution stop dans tous les puits dans le même ordre à la même vitesse que pour la solution de TMB. Secouer doucement la microplaque.

   La couleur bleue développée pendant l'incubation vire au jaune.
8. Mesurer l'absorbance (E) des échantillons à 450 nm contre une longueur d'onde de référence de 620-630 nm ou contre le blanc au cours de 5 minutes après l'adjonction de la solution stop.

8.2. Mesure

Faire le **zéro** du lecteur ELISA **à l'aide du blanc dans le puits A1**.

Si - pour des raisons techniques - le lecteur d'ELISA ne peut pas être ajusté à zéro en utilisant le blanc dans le puits A1, soustraire la valeur d'absorbance du puits A1 de toutes les autres valeurs d'absorbance mesurées afin d'obtenir des résultats fiables !

Mesurer l'absorbance de tous les puits **à 450 nm** et enregistrer les valeurs d'absorbance pour chaque contrôle et échantillon de patient dans le plan de distribution et d'identification.

Calculer **les valeurs moyennes d'absorbance pour tous les doublets, si nécessaires**.

9. RESULTATS

9.1. Calcul des résultats

Calculer l'absorbance moyenne pour chaque point de la courbe étalon et de chaque échantillon. Tracer la valeur d'absorbance moyenne des étalons par rapport à la concentration. Dessiner le meilleur ajustement de la courbe sur les points tracés (4 paramètres logistiques).
Interpoler les valeurs des échantillons sur la courbe étalon pour obtenir les valeurs de concentrations correspondantes en pg/ml.

9.2. Valeurs de Référence

Les concentrations des sérums de la testostérone libre sont dans le tableau suivant :

	Médiane	Moyenne±1SD pg/ml	Gamme pg/ml
Homme / Femme Normal :	14	13±7	4.5 - 42
Ovulation	1.3	1.4±0.9	ND - 4.1
Contraception Orale	0.9	1.1±0.6	0.3 - 2.0
Post ménopause	0.8	0.9±0.5	0.1 – 1.7

Prenez garde au fait que la détermination d'une gamme de valeurs attendues pour une population "normale" d'une méthode donnée dépend de plusieurs facteurs, comme la spécificité et la sensibilité de la méthode utilisée et le genre de population étudiée. Par conséquent chaque laboratoire doit considérer que la gamme donnée comme une indication générale par le fabriquant et produit sa propre gamme de valeurs attendues basée sur la population où est situé le laboratoire.

10. CONTROLE QUALITE

Chaque laboratoire doit faire des contrôles de dosage à des niveaux de gammes normales, élevées et faibles de testostérone libre pour surveiller la performance des dosages. Ces contrôles doivent être considérés comme inconnus et les valeurs doivent être déterminées dans chaque test effectué. Les chartes de contrôles qualité doivent être maintenues pour suivre les performances des réactifs fournis. Des méthodes de statistiques pertinentes doivent être employées pour établir des tendances. Le laboratoire individuel doit établir des limites de performance de dosage acceptables. D'autres paramètres devant être surveillés impliquent les intersections à 80, 50 et 20% de la courbe étalon pour la reproductibilité. De plus, l'absorbance maximale doit être dans la même ligne que les expériences passées. Les déviations significatives provenant des performances établies peuvent indiquer un changement non remarquable dans les conditions expérimentales ou dans la dégradations des réactifs du kit. Les réactifs frais doivent être utilisés pour déterminer la raison des variations.
Si la diminution des données contrôlées par ordinateur est utilisée pour calculer le résultat du test, il est impératif que les valeurs prédites pour l'étalonnage tombent dans les 10% des concentrations assignées.

11. PERFORMANCE DU DOSAGE

11.1. Précision

Variation Intra Dosage
La variation intra dosage a été déterminée par un réplicat (x15) sur trois différents sérums dans un dosage. La variation à l'intérieur d'un dosage est < 10 %.

Variation Inter Dosage
La variation entre les dosages a été déterminée par un réplicat des mesures de cinq contrôles de sérums différents et de deux sérums différents dans 10 dosages. La variation entre les dosages est < 10 %.

11.2. Spécificité analytique

La spécificité est évaluée en mesurant la réponse apparente du dosage des potentielles réactivités croisées des analytes suivants et des substances interférentes (Anticoagulants). La réaction croisée des anticorps, calculées à 50% selon Abraham :

Testostérone	100.0 %
DHT	0.00008 %
Androsténédione	0.0043 %
Androstérone	0.00029 %
DHEA-S	0.00007 %
Cortisol	< 0.00001 %
Cortisone	< 0.00001 %
17 β Estradiol	0.00005 %
Estrone	< 0.00001 %
Prédnisone	< 0.00001 %
17 α Ethynilestradiol	< 0.00001 %
Norgestrel	0.00001 %
Danazol	< 0.00001 %
Aldostérone	< 0.00001 %
Citrate de sodium	< 0.00001 %
EDTA	< 0.00001 %
Héparine	< 0.00001 %

11.3. Sensibilité Analytique

La sensibilité est évaluée en utilisant 20 réplicats de l'étalon 0 et minimum 2 de l'étalon 1. La plus petite concentration détectable de testostérone libre est 0.06 pg/ml.

11.4. Comparaison de méthode

La méthode ELISA de la testostérone libre a été comparée à un autre dosage de testostérone libre disponible dans le commerce (RIA). 41 échantillons de sérum ont été analysés selon les deux systèmes d'essais.
La régression linéaire a été calculée

(Testostérone Libre NovaTec) = 0.957*(Testostérone Libre RIA) + 0.953

r^2 = 0.937

12. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

- En accord avec l'article 1 paragraphe 2b de la directive européenne 98/79/EC, l'utilisation des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro est destinée par le fabricant à garantir la pertinence, les performances et la sécurité du produit. Par conséquent, la procédure de dosage, l'information, les précautions et mises en garde de la notice d'emploi, doivent être suivies de façon stricte. L'utilisation de ces kits avec des automates ou dispositifs similaires doit être validée. Aucun changement de la conception, composition et procédure de dosage, ainsi que l'utilisation avec d'autres produits non approuvés par le fabricant, ne sont autorisés ; seul l'utilisateur est responsable de tels changements. Le fabricant n'est pas responsable des faux résultats et des incidents dus à ces modifications. Le fabricant n'est pas responsable des résultats fournis par analyse visuelle des échantillons des patients.
- Uniquement pour diagnostic in vitro.
- Si vous utilisez l'équipement automatisé, l'utilisateur a la responsabilité de s'assurer que le kit a été convenablement évalué. Pour améliorer la performance du kit sur les systèmes automatiques ELISA, on recommande d'augmenter le nombre de se lave.
- Tous les composants d'origine humaine utilisés pour la fabrication de ces réactifs ont été analysés et ont été testés non réactifs aux antigènes HBs, en anticorps anti-VHI et en anticorps anti-VHC. Néanmoins, tous les produits doivent être considérés et traités comme étant potentiellement infectieux.
- Ne pas utiliser de réactifs provenant d'autres fabricants avec les réactifs de ce kit.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Utiliser seulement des cônes de pipette, des distributeurs et du matériel de laboratoire propres.
- Ne pas échanger les bouchons des flacons, pour éviter la contamination croisée
- Fermer les flacons de réactifs immédiatement après l'utilisation pour éviter l'évaporation et la contamination microbienne.
- Avant une nouvelle utilisation, vérifier les flacons de conjugué et de contrôle, déjà utilisés, pour exclure une contamination microbienne.
- Pour éviter la contamination croisée et des résultats faussement élevés, introduire les échantillons de patients et le conjugué exactement au fond des puits sans éclabousser.
- Utiliser les Equipements de Protection Individuels (EPI) appropriés dans de l'utilisation des réactifs fournis.
- Suivre les Bonnes Pratiques de Laboratoires (BPL) pour la manipulation de produits sanguins.
- Certains réactifs contiennent de petites quantités de Proclin 300® comme conservateur. Eviter le contact avec la peau ou les muqueuses.

- Le TMB est un réactif irritant qui peut être nocif s'il est inhale, ingéré ou absorbé par la peau. Eviter toute ingestion, inhalation, contact avec la peau ou les yeux.
- La solution stop est une solution diluée d'acide sulfurique. L'acide sulfurique est un poison, corrosif et peut être toxique s'il est ingéré. Eviter tout contact avec la peau et les yeux pour éviter une brûlure chimique.
- Eviter l'exposition du réactif TMB/ H_2O_2 à la lumière du soleil, aux métaux et oxydants. Ne pas congeler la solution.
- Cette méthode permet la détermination de la testostérone libre entre 0.06 pg/mL et 100.0 pg/mL.
- La signification clinique de la détermination de la testostérone libre peut ne pas être établie si le patient suit un traitement à la cortisone ou au stéroïdes naturels ou synthétiques.
- Si le liquide n'est pas complètement extrait des puits, cela peut influence la précision du dosage et/ou augmenter le bruit de fond
- Il est important que le temps de réaction dans chaque puits soit constant pour la reproductibilité. Le pipetage des échantillons ne doit pas prendre plus de 10 minutes afin d'éviter toutes dérives du dosage. Si cela dure plus de 10 minutes, suivre le même ordre d'utilisation. Si plusieurs plaques sont utilisées, il est recommandé de répéter la courbe dose/réponse dans chaque plaque.
- L'ajout de TMB initie la réaction cinétique qui se termine par l'ajout de solution stop. Par conséquent, l'addition de solution de substrat et de solution stop doit être ajouté dans la manipulation pour éliminer toutes erreurs pendant la réaction.
- Suivre le mode d'emploi pour effectuer le contrôle qualité dans les laboratoires médicaux en dosant les contrôles et les sérums.
- Une grande précision est nécessaire pour la reconstitution et le dépôt des réactifs.
- Les échantillons contaminés microbiologiquement, hautement lipémiques ou hémolysés ne doivent pas être utilisés dans le dosage.
- Les lecteurs de microplaques mesurent verticalement. Ne pas toucher le fond des puits.
- Le kit ELISA de NovaTec est uniquement destiné à être utilisé par un personnel qualifié familiarisé avec les BPL.

12.1. Elimination des déchets

Les résidus des produits chimiques et des préparations sont considérés en général comme des déchets dangereux. L'élimination de ce type de déchet est réglementée par des lois et réglementations nationales et régionales. Contacter les autorités compétentes ou les sociétés de gestion des déchets pour obtenir des renseignements sur l'élimination des déchets dangereux.

13. INFORMATION POUR LES COMMANDES

Prod. No.:	DNOV009	Free Testosterone (96 Déterminations)

BIBLIOGRAPHY / BIBLIOGRAPHIE

McCann D., Kirkish L. (1985) J. Clin. Immunoassay 8, 234 - 6.
Ekins RP. (1984) J. Clin. Immunoassay 7(2), 163 – 80.
Paulson JD et al. (1977) Am. J Obst. Gynecol 128, 851 – 7.
Odlind V. et al. (1982) Clin. Endocrinology 16, 243 – 49.
Green PJ. (1982) Clin Chem 28, 1237.
Wu CH, Obstet Gynecol. 1982; 60:188-94

Symbols Key/ Symbolschlüssel/ Explication des symboles / Legenda / Símbolos/ Tabela de símbolos	
	Manufactured by / Hergestellt von/ Fabriqué par/ Prodotto da/ Fabricado por / Fabricado por
IVD	In Vitro Diagnostic Medical Device/ In Vitro Diagnosticum/ Dispositif médical de diagnostic *in vitro*/ Diagnostico *in vitro*/ Producto para diagnóstico In vitro / Dispositivo Médico para Diagnóstico In Vitro
LOT	Lot Number/ Chargenbezeichnung/ Numéro de lot/ Lotto/ Número de lote / Número de lote
	Expiration Date/ Verfallsdatum/ Date de péremption/ Scadenza/ Fecha de caducidad / Data de Validade
	Storage Temperature/ Lagertemperatur/ Température de conservation/ Temperatura di conservazione / Temperatura de almacenamiento / Temperatura de Armazenamento
	Keep away from sunlight / Vor direkter Sonneneinstrahlung schützen / Protéger de rayonnement solaire / Mantener alejado de la luz solar
CE	CE Mark/ CE-Zeichen/ Marquage CE / Marchio CE/ Marca CE / Marca CE
REF	Catalogue Number/ Katalog Nummer/ Référence du catalogue/ Numero di codice/ Número de Catálogo / Número de Catálogo
	Consult Instructions for Use/ Gebrauchsanweisung beachten/ Consulter la notice d'utilisation/ Consultare le istruzioni/ Consulte las Instrucciones de Uso / Consultar as Instruções de Utilização
MTP	Microplate/ Mikrotiterplatte/ Microplaque/ Micropiastra/ Microplaca / Microplaca
CONJ	Conjugate/ Konjugat/ Conjugué/ Coniugato/ Conjugado / Conjugado
CONTROL	Control/ Kontrolle/ contrôle / controllo / control / controle/ controlo
CAL	Calibrator resp. Standard/ Kalibrator bzw. Standard/ Callibrateur resp Etalon / Calibratore ossia Standard / Calibrador o bien Estándar
SOLN STOP	Stop solution/ Stopplösung/ Solution stop/Soluzione bloccante / Solução de paragem
SUB TMB	TMB Substrate solution/ TMB-Substratlösung/ Substrat TMB/ soluzione substrato TMB/ solución substrato TMB / Solução substrato TMB
WASH BUF 10x	Washing solution 10x concentrated/ Waschlösung 10x konzentriert/ Solution de lavage concentré 10 x/ soluzione di lavaggio concentrazione x10/ solución de lavado concentrado x10 / Solução de lavagem concentrada 10x
	Contains sufficient for "n" tests/ Ausreichend für "n" Tests/ Contenu suffisant pour "n" tests/ Contenuto sufficiente per "n" saggi/ Contenido suficiente para "n" tests / Conteúdo suficiente para "n" testes

SCHEME OF THE ASSAY

Free Testosterone

Test Preparation

Prepare reagents and samples as described.
Establish the distribution and identification plan for all specimens and controls on the result sheet supplied in the kit.

Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Assay Procedure

	Substrate blank	Standard 0 - 5	Control	Sample
Standard 0 - 5	-	20 µl	-	-
Control	-	-	20 µl	-
Sample	-	-	-	20 µl
Conjugate	-	100 µl	100 µl	100 µl
Cover wells with foil supplied in the kit **Incubate for 1 h at 37 °C** Wash each well three times with 300 µl diluted wash solution (if you use automated equipment wash the wells at least 5 times)				
TMB Substrate	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Incubate for exactly 15 min at room temperature in the dark				
Stop Solution	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Shake the microplate gently. Photometric measurement at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against blank within 5 minutes.				

NovaTec Immundiagnostica GmbH

Technologie & Waldpark

Waldstr. 23 A6
D-63128 Dietzenbach, Germany

Tel.: +49 (0) 6074-48760 Fax: +49 (0) 6074-487629
Email : info@NovaTec-ID.com
Internet: www.NovaTec-ID.com

DNOV009-engl,fr-13112013-CS